No 52. **E. Dober,** und **P. A. Tschumi,** Bern. — Entwickeln sich die Extremitäten von *Xenopus laevis* Daud. ohne Epidermisleiste?

(Mit 5 Textabbildungen.)

Zoologisches Institut der Universität Bern, Abteilung für Entwicklungsphysiologie. Leitung: Prof. Dr. P. A. Tschumi.

Einleitung

Seit Beginn der entwicklungsphysiologischen Arbeiten an der Tetrapodenextremität waren die Probleme der Determination und insbesondere der Bedeutung von Mesoderm und Ektoderm für die Gliedmassenentwicklung von besonderem Interesse. (Braus 1906; Harrison 1918; Steiner 1921; Balinsky 1927, 1929, 1931, 1935; Filatow 1928, 1930; Mangold 1929; Detwiler 1933; Rotmann 1933; u.a.). Schon in den 20er und 30er Jahren ist der Epidermis eine morphogenetische Rolle zugeschrieben worden, allerdings ohne dass die damals vorliegenden Befunde eine endgültige Lösung des Problems erlaubt hätten.

Erst die Ergebnisse Saunders (1948) gaben der Entwicklungsphysiologie in obiger Richtung neue Impulse. Seine Theorie über die Bedeutung des Ektoderms und insbesondere über die Unentbehrlichkeit der Epidermis- oder Randleiste erweckte wiederum lebhaftes Interesse für das Problem der Wechselwirkung zwischen Epidermis und Mesenchym und insbesondere für die Bedeutung der Leiste für das apikale Wachstum der Knospe.

Zu diesem Problem sind zwei verschiedene Hypothesen aufgestellt worden:

— Verschiedene Forscher (Saunders, Zwilling, Tschumi, Hampé, Milaire, u.a.) halten das Vorhandensein einer Leiste für notwendig und glauben, dass die Epidermisleiste die Bildung der Extremitätenelemente durch Proliferation aus proximaleren Bereichen des Mesoblasten veranlasst.

— Andere Forscher (Amprino, Camosso, Barasa, Bell, u.a.) deuten die Leiste als Stauungs und Abbauzone der an der Extremitätenbasis wachsenden Epidermis; jedenfalls sprechen sie ihr eine morphogenetisch — induktive Wirkung ab.

Die Frage nach der Bedeutung und Funktion dieser Leiste ist heute, zwanzig Jahre nach der ersten Saunder'schen Arbeit und trotz einer Vielzahl von Experimenten (Saunders 1948, Saunders, Cairns & Gasseling 1955, 1957, 1959; Zwilling 1949, 1955, 1956, 1961; Zwilling & Hansborough 1956; Searls and Zwilling 1964; Tschumi 1956, 1957; Hampé 1956; Milaire 1956, 1963, 1965; Abott und Mitarbeiter 1960; Ede and Kelly 1964; Goetnick 1964; Hinrichsen 1956; Mc Alpine 1956; Monis 1965; Mottet 1967; Amprino und Camosso 1956a, b, 1961a, b, 1965; Amprino und Amprino Bonetti 1964; Camosso, Jacobelli e

PAPALETTERA 1960; BELL 1959; BALINSKY 1956; u.a.) noch immer nicht eindeutig beantwortbar.

Obwohl Anurenextremitäten keine so auffällige Leiste aufweisen wie die Extremitäten der Vögel (SAUNDERS 1948) und Säuger (MILAIRE 1956), konnte TSCHUMI (1956, 1957) mittels Dünnschnitten senkrecht zur Marginalvene, welche unmittelbar unter der Epidermisleiste liegt, für die Hinterbeinknospe von Xenopus das Vorhandensein einer Leiste nachweisen. Frühere Untersuchungen von DOBER (1968) an der Vorderbeinknospe liessen jedoch vermuten, dass eine morphologisch vergleichbare Leiste hier kaum vorhanden sein dürfte.

Es war daher angebracht, nochmals gründlich zu prüfen, ob an der Vorder- wie Hinterextremität von Xenopus laevis eine Leiste überhaupt vorhanden ist.

METHODE

Es wurde auf zwei Arten versucht die Leiste nachzuweisen:

1. *Methode der Trockenpräparation:*

Rezept:

Larven verschiedener Entwicklungsstadien in 40%-igem Formol 6-12 Stunden fixiert.
Auswaschen mit Alkohol steigender Konzentration je einige Stunden.
Entwässern mit Methylbenzoat mindestens 24 Stunden

Xylol I	4 Stunden
Xylol II	4 Stunden
Xylol — Terpentin 2:1	4 Stunden
Xylol — Terpentin 1:2	4 Stunden
Terpentin rein	24 Stunden

Die Präparate wurden dann im Wärmeschrank auf Filtrierpapier ausgelegt, um das Terpentin bei ungefähr dreissig Grad Celsius langsam eindunsten zu lassen.

Die Objekte waren nach einigen Tagen trocken und weiss wie Gips, jedoch wiesen sie Schrumpfungen auf, was auf den überdurchschnittlich hohen Wassergehalt der Larven zurückzuführen ist. Indessen wiesen die kompakten Körperteile, wie Extremitäten und Schwanzmuskulatur, keine Schrumpfungen auf, so dass sie für die Untersuchungen geeignet schienen.

Mit den Xenopuslarven wurden gleichzeitig einige Hühnerembryonen als Kontrolle mitpräpariert. Letztere ergaben einwandfreie Trockenpräparate, bei denen die Leiste gut erkennbar war. Unter dem Binokular wurde dann versucht, durch Schattenwurf mittels tangentialer Beleuchtung der Knospenspitze, die Leiste sichtbar zu machen.

2. *Histologische Dünnschnitte*

Für die histologischen Untersuchungen wurden Larven der Stadien 46—52 (nach Nieuwkoop und Faber) in Bouin fixiert, in Paraplast (Schmelzpunkt 57 Grad C) eingebettet, in 6μ dicke Schnitte zerlegt und mit Azan nach Heidenhain gefärbt.

Für die Untersuchungen war die Lage der Schnittebenen von entscheidener Bedeutung. Es wurden drei verschiedene Schnittebenen gewählt:

a) Querschnitt durch die Knospe.

b) Schnitt senkrecht zur Marginalvene.

c) Schnitt parallel zur Marginalvene.

Ergebnisse

1. *Trockenpräparate*

Die Auswertung der Trockenpräparate mittels Schattenwurftechnik ergab eindeutig, dass weder am Hinter- noch am Vorderbein eine Leiste deutlich ausgebildet ist.



Abb. 1.

Querschnitt durch eine Vorderextremität.
Im Bereich der deutlich sichtbaren Marginalvene ist keine Epidermisleiste erkennbar.
Stadium 49. Vergrösserung: 70-fach.

2. *Dünnschnitte*

Die Untersuchung und Auswertung von ca. 50 lückenlosen Schnittserien in allen drei Schnittebenen für alle Entwicklungsstadien der Xenopus-Hinter- wie auch Vorderextremität ergab keinen einzigen eindeutigen Fall einer ausgebildeten Leiste. Weder die Querschnitte (Abb. 1), noch die Schnittserien senkrecht zur

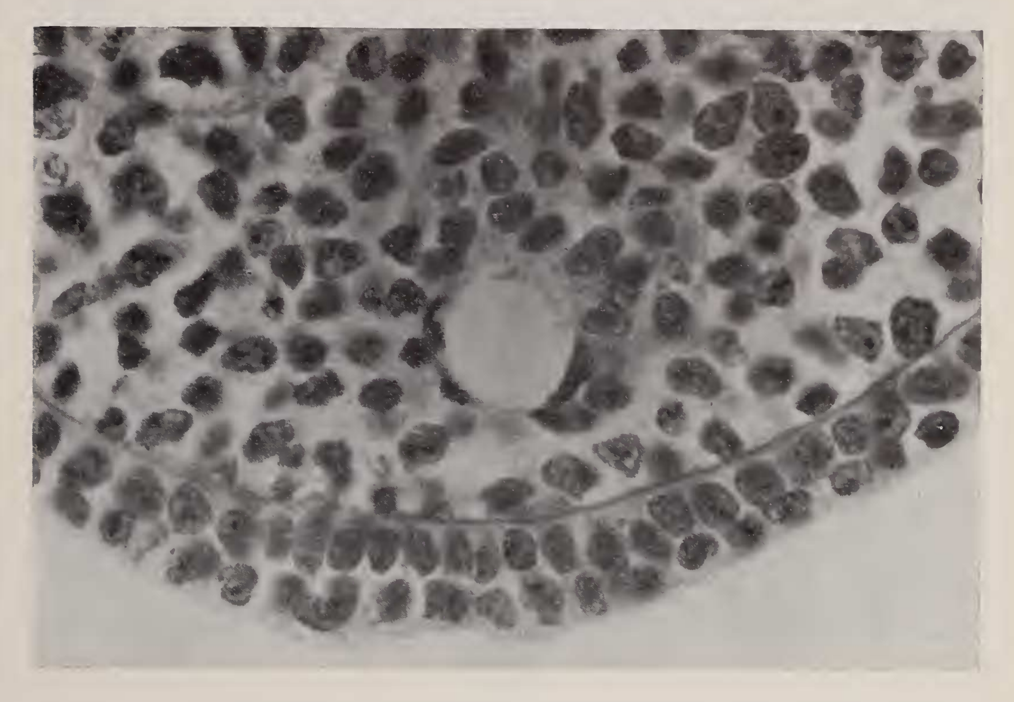


Abb. 2.

Knospenspitze einer Hinterextremität, senkrecht zur Marginalvene geschnitten. Die Epidermis ist zweischichtig, schwach verdickt und der Basalmembran unmittelbar anliegend. Keine pyknotischen Zellen erkennbar.
Stadium 50. Vergrösserung: 750-fach.

Marginalvene (Abb. 2 u. 3) ergaben im Bereich der meist deutlich sichtbaren, dem distalen Rand der Knospe entlangführenden Marginalvene, eine auch nur andeutungsweise vorhandene Epidermisleiste. Bei allen Schnitten war die Epidermis längs der ganzen Knospe stets zweischichtig, wenn auch von unterschiedlicher Struktur. So besteht die Epidermis, vornehmlich bei der Hinterextremität, im distalsten Abschnitt aus zwei mehrheitlich aus kubischen Zellen bestehenden Schichten (Abb. 3). Die Epidermis aus allen proximalen Extremitätenbereichen dagegen besteht aus einem kubischen und einem darüberliegenden plattenförmigen Epithel (Abb. 4).

Von besonderem Bau scheint die Epidermis der Vorderextremitätenspitze zu sein. Im Gegensatz zur Epidermis an der Spitze des Hinterbeins liegen hier die Kerne nicht unmittelbar der Basalmembran an. Es ergibt sich dadurch eine Zone, die optisch mehr oder weniger leer wirkt. Die proximale Epidermis hingegen ist gleich wie jene der Vorderextremität (Abb. 3).

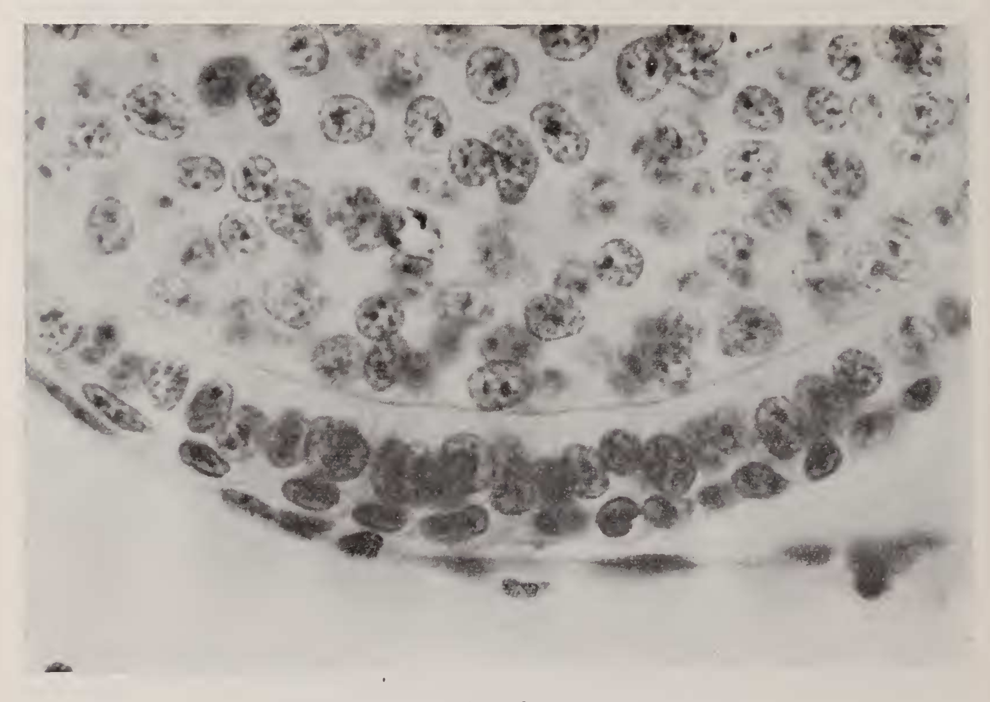


Abb. 3.

Schnitt senkrecht zur Marginalvene einer Vorderextremität. Keine Leiste im Bereich der Marginalvene erkennbar. Auffallend ist, dass die Kerne der Epidermis der Basalmembran nicht unmittelbar anliegen.
Stadium 50. Vergrösserung: 750-fach.

Inwieweit dieser beachtliche Unterschied auf der Tatsache beruht, dass sich die Vorderextremität, im Gegensatz zur Hinterextremität, unter dem Integument entwickelt, kann noch nicht entschieden werden.

Von den ungefähr fünfzig untersuchten Knospen konnte nur an vereinzelten Schnitten durch eine linke Vorderbeinknospe (Stadium 49/50) eine schwach ausgebildete Leiste gefunden werden (Abb. 5). In diesem einzigen Fall ist über der gut sichtbaren Marginalvene die Knospenspitzenepidermis leicht verdickt und auch mehrschichtig. Auffallend sind dabei die nur in diesem Bereich auftretenden pyknotischen Zellen. Die restliche Epidermis scheint über die ganze Knospe hinweg von gleicher Struktur zu sein.

Diskussion

Auf Grund der histologischen Belege lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Sowohl an der Vorderbeinknospe wie an der Hinterbeinknospe von Xenopus laevis ist auf keinem Entwicklungsstadium eine morphologisch wohlaus-



Abb. 4.
Epidermis aus proximalen Extremitätenbreichen ist sowohl an der Vorder- wie Hinterextremität einheitlich gleich aufgebaut. Stadium 50. Vergrösserung: 750-fach.

gebildete Leiste im Sinne Saunders, nachzuweisen. Die zuweilen in späteren Entwicklungsstadien höchstens andeutungsweise vorhandene Leiste ist histologisch nicht mit der Leiste von Hühnchen und Mausembryonen vergleichbar (vergl. mit Moscona and Monroy 1966; p. 264; Balinsky 1965; p. 407; De Haan and Ursprung 1965; p. 284-286).

2. Liegt ausnahmsweise eine leistenähnliche Verdickung am Knospenende vor, so fällt auf, dass sich in ihr stets pyknotische Zellen befinden. Eine solche leistenähnliche Verdickung dürfte daher kaum als wesentliches Element der Organisation der Extremitätenentwicklung und als Bestandteil eines Steuerungssystems bei der Determination der einzelnen Extremitätenab-

schnitte zu betrachten sein (SAUNDERS — ZWILLING — Modell). Viel eher ist eine solche Verdickung als Ergebnis einer Stauung distaler Epidermis, bedingt durch das überschnelle Wachstum der proximalen Epidermisbereiche, zu deuten (TSCHUMI 1957, AMPRINO und CAMOSSO 1958; DOBER 1968). Die pyknotischen Zellen deuten an, dass diese als Leiste erscheinende Stauungszone möglicherweise abgebaut wird.

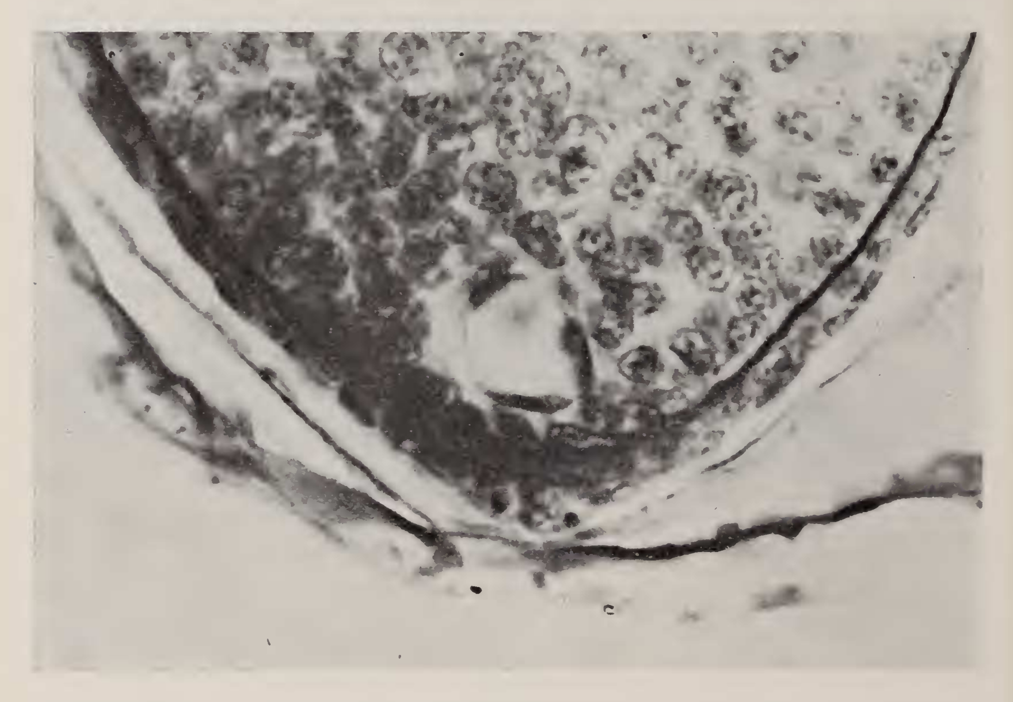


ABB. 5.

Einziger Fall einer andeutungsweise ausgebildeten Leiste.
Auffallend sind die pyknotischen Zellen.
Stadium 49/50. Vergrösserung 500-fach.

3. Keine sichtbare Leiste am Vorder- und Hinterbein bedeutet, dass apikales Wachstum in Abwesenheit einer Saunder'schen Leiste durchaus möglich ist.

ZUSAMMENFASSUNG

Trotz sorgfältigster Präparation (Trockenmethode und histologische Dünnschnitte, insbesondere Querschnitte und Schnitte senkrecht zur Marginalvene) konnte eine Epidermis- oder Randleiste im Sinne Saunders weder an der Vorderextremität noch an der Hinterextremität von Xenopus laevis Daud. nachgewiesen werden. Vielmehr scheint eine selten vorkommende, mässige Zellanhäufung an der

Knospenspitze von älteren Entwicklungsstadien (Stadien 49/50 nach NIEUWKOOP und FABER), die ausserdem von pyknotischen Zellen durchsetzt ist, die Folge einer Epidermisstauung — verursacht durch das intensive proximo-distale Wachstum der Epidermis — zu sein.

Die vorliegenden Beobachtungen zeigen, dass ein apikales Extremitätenwachstum in Abwesenheit einer Extremitätenleiste im Sinne Saunders durchaus möglich ist.

LITERATUR

ABBOTT, U. K., L. W. TAYLOR and H. ABPLANALP, 1960. J. Heredety 51. 195.

AMPRINO, R. 1965. In "*Organogenesis*" (R. L. de Haan and Ursprung eds.) 255-281. Holt, New York.

— and D. AMPRINO BONETTI, 1964. *Effect of the implantation on the development of grafted limb bud mesoderm in chick embryos.* Nature 204: 298.

— e M. CAMOSSO, 1956a. *Ricerche sperimentali sulla morphogenesi degli arti nel pollo.* J. exp. Zool. 129: 453.

— et M. CAMOSSO, 1956b. *Le rôle morphogénétique de la crête ectodermique apicale du bourgeon des membres de l'embryon de poulet.* C. R. Assoc. Anat. Paris, juillet: 197-203.

— et M. CAMOSSO, 1961a. *Greffes hétérotropiques d'ectoderme et mésenchyme marginal de l'ébauche des extrémités. Etude histologique.* C. R. Assoc. Anat. 47: 62-68.

— and M. CAMOSSO, 1961b. *Development of digits from the proximal pre-axial material of the wing and hind limb bud in chick embryos.* Experientia 17: 92-93.

— and M. CAMOSSO, 1965. *Developmental fate of heterotropically grafted proximal preaxial material of the chick embryo limb bud.* Acta. Anat.

BALINSKY, B. I. 1927a. *Xenoplastische Ohrbläschentransplantation zur Frage der Induktion einer Extremitätenanlage.* Roux' Archiv 110: 63-70.

— 1927b. *Ueber experimentelle Induktion der Extremitätenanlage bei Triton mit besonderer Berücksichtigung der Innervation und Symmetrieverhältnisse derselben.* Roux'Archiv 110: 71-88.

— 1929. *Ueber die Mesodermverschiebungen bei der Extremitäteninduktion.* Roux' Archiv 116: 404-632.

— 1931. *Zur Dynamik der Extremitätenknospenbildung.* Roux' Archiv 123: 556-648.

— 1935. *Selbstdifferenzierung des Extremitätenmesoderms im Interplantat.* Zool. Jahrb. Zool. Physiol. 54: 327-348.

— 1956. *A new theory of limb induction.* Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. 42: 781-785.

— 1965. *An introduction to embryology.* W. B. Saunders company. Philadelphia and London.

BELL, E., M. E. KAIGHN, and L. M. FESSENDEN, 1959. *The role of mesodermal and ectodermal components in the development of the chick limb.* Develp. Biol. 1: 101.

— J. W. SAUNDERS and E. ZWILLING, 1959. *Limb development in the absence of ectodermal ridge.* Nature 184: 1736-1737.

BRAUS, H. 1906. *Die Entwicklung der Form der Extremitäten und des Extremitätenskeletts.* In: HERTWIG: Handb. d. vergl. u. exp. Entw.lehre. Bd. 3, Teil 2: 167-338.

Camosso, M., V. Jacobelli e N. Papalettera, 1960. *Ricerche descritive e sperimentali sull'organogenesi dell'abbozzo dell' ala dell'embrione di pollo.* Riv. Biol. 52: 323-357.

De Haan, R. L. and H. Ursprung, 1965. *Organogenesis.* Holt, Rinerhart and Winston, New York, San Francisco, Toronto and London.

Detwiler, S. R. 1933. *On the time of determination of the antero — posterior axis of the forelimb in amblystoma.* J. exp. Zool. 64: 405-414.

Dober, E. 1968. *Die Wachstumsweise von Vorderbeinknospen von Xenopus laevis Daud.* Rev. Suisse Zool. 75: 523-531.

Ede, D. A. and W. A. Kelly, 1964. *Developmental abdominalitis in the trunk on limbs of talpid 3 mutant of the fowl.* J. Embryol. exp. Morph., vol. 12, part 2: 339-356.

Filatow, D. 1928. *Ueber die Verpflanzung des Epithels und des Mesenchyms einer vorderen Extremitätenknospe bei Embryonen von Axolotl.* Roux' Archiv. 113: 240-244.

— 1930a. *Die Beeinflussung der Extremitätenanlage von Anuren durch in ihrer Nähe angebrachte Transplantate.* Roux'Archiv 121: 272-287.

— 1930b. *Ueber die Wechselbeziehungen des Epithels und des Mesenchyms einer vorderen Extremitätenknospe bei Axolotl.* Roux'Archiv 121: 288-311.

Goetinck, P. F. 1964. *Studies on avian limb morphogenesis. II. Experiments with the polydactylous mutant, eudiplopodia.* Develop. Biol. 10: 71-91.

Hampé, A. 1956. *Sur la topographie des ébauches présomptives du membre postérieur du poulet.* Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 243: 970-973.

Harrison, R. G. 1918. *Experiments on the development forelimb of Amblystoma. A self-differentiating equipotential system.* J. exp. Zool. 25: 413-461.

Hinrichsen, K. 1956. *Die Bedeutung der epithelialen Randleiste für die Extremitätenentwicklung.* Z. Anat. Entw. gesch. 119: 350-364.

Mangold, O. 1929. *Das Determinationsproblem, II. Die paarigen Extremitäten der Wirbeltiere in der Entwicklung.* Erg. Biol. 5.

Mc Alpine, R. J. 1956. *Alcaline glycerophosphatase in the early development of the limb buds of the rat embryo.* Anat. Rec. 121: 408.

Milaire, J. 1956. *Contribution à l'étude morphologique et cytochimique des bourgeons de membre chez le rat.* Arch Biol. Liège, 67: 297-391.

— 1963. *Etude morphologique et cytochimique du développement des membres chez la souris et chez la taupe.* Arch. Biol. Liège. 74: 128-317.

— 1965. *Etude morphogénétique de trois malformations congénitales de l'autopode chez la souris (syndactylisme — brachipodisme — hémimelie dominante) par des méthodes cytochimiques.* Acad. Roy. Belg. Classe Sci. Mem. Collection in 8.

Monis, B. 1965. *Aminopeptidase activity in granulation tissue in the scorbutic guinea pig.* Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 119: 628-630.

Moscona, A. A. and A. Monroy, 1966. *Current topics in developmental biology.* Academic Press. New York, London.

Mottet, N. K. 1967. *Activity of aminopeptidases (aminonaphthylamidases) during early bud differentiation in the chick embryo.* J. exp. Zool. 165: 297-292.

Nieuwkoop, P. D. and J. Faber, 1956. *Normal table of Xenopus laevis.* North Holland Comp. Amsterdam.

Rotmann, E. 1933. *Die Rolle des Ektoderms und Mesoderms bei der Formbildung der Kiemen und Extremitäten von Triton II. Operationen im Gastrula- und Schwanzknospenstadium.* Roux' Archiv 129: 85-119.

SAUNDERS, J. W. 1948. *The proximo — distal sequence of origin of the parts of the chick and the role of the ectoderm.* J. exp. Zool. 108: 363-404.

— CAIRNS, J. M. and GASSELING, M. T. 1955. Nature 175: 673.

— CAIRNS, J. M. and GASSELING, M. T. 1957. *The role of the apical ridge of ectoderm in the differentiation of morphological structure and inductive spesifity of limb parts in the chick.* J. Morph. 101: 57-87.

— CAIRNS, J. M. and GASSELING, M. T. 1959. *The differentiation of prospectiv thigh mesoderm grafted beneath the apical ectodermal ridge of the wing bud in the chick embryo.* Develop. Biol. 1: 281-301.

SEARLS, R. L. and E. ZWILLING, 1964. *Regeneration of the apical ectodermal ridge of the chick embryo limb bud.* Develop. Biol. 9: 38-55.

STEINER, H. 1921. *Hand und Fuss der Amphibien.* Anat. Anz. 53: 513-542.

STEINER, K. 1928. *Entwicklungsmechanische Untersuchungen über die Bedeutung des ektodermalen Epithels der Extremitätenknospe von Amphibienlarven.* Roux' Archiv 113: 1-11.

TSCHUMI, P. A. 1956. *Die Bedeutung der Epidermisleiste für die Entwicklung von Xenopus leavis Daud.* Rev. Suisse Zool. 63: 707-716.

— 1957. *The growth of the hindlimb bud of Xenopus laevis and its dependence upon the epidermis.* J. Anat. 91: 149-173.

ZWILLING, E. 1949. *The role of the relationship in the developmental origin of the " wingless " syndrome of the chick embryos.* J. exp. Zool. 111. 175-188.

— 1955. *Ectoderm — mesoderm relationship in the development of the chick embryo limb bud.* J. exp. Zool. 128: 423-441.

— 1956. *Reciprocal dependence of ectoderm and mesoderm during limb development.* Am. Anat. 90: 257-265.

— 1956a-d. *Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the chick embryo.* J. exp. Zool. 132: 157-187, 219-253.

— 1961. *Limb morphogenesis.* Acad. Press Inc. New York. Vol. 1: 301-330.

— and L. A. HANSBOROUGH, 1956. *Interaction between limb bud ectoderm and mesoderm in the Chick embryo. III. Experiments with polydactylous limbs.* J. exp. Zool. 132: 219-239.

Nº 53. **A. M. Du Bois, R. Martin Du Pan, B. Koechli et A. M. Hyde.** — Effets de l'exercice physique sur la teneur en RNA des motoneurones. (Avec 2 figures)

Institut d'Histologie, Ecole de Médecine, Genève
Centre de Transfusion, Hôpital cantonal, Genève.

On sait, depuis longtemps, que l'activité des neurones peut être appréciée par les variations en nombre et en volume des corpuscules de Nissl, c'est à dire par leur teneur en acide ribonucléïque (RNA) cytoplasmique.